

## 明 細 書

抗糖尿病剤の標的タンパク質及び対応する新規抗糖尿病剤「インスフル

」

### 技術分野

- [0001] 本発明は、公知の抗糖尿病剤の標的タンパク質及び当該タンパク質を用いた新規抗糖尿病剤のスクリーニング方法に関する。

### 背景技術

- [0002] 糖尿病患者はWHOの推計によれば、現在(2003年)世界中で1億5000万人であり、2025年には3億人に達するといわれている。現在の米国では人口の6%が糖尿病を罹患しており、糖尿病が原因となる合併症対策コストを合わせた関連医療費は97年には980億ドルに達している。世界における経口血糖降下剤の市場は8000億～9000億円と推定され、2010年には2兆～3兆円に達するという推定もある。
- [0003] 日本では98年の調査で患者数690万人であり、インスリンの効き目が低下し、糖尿病の予備軍とされる耐糖能異常を示す人を合わせると1370万人に達した。糖尿病の薬物療法にはインスリンのような注射型剤のほかに経口型薬剤があるが、合計は1800億～2100億円と推定される。
- [0004] 糖尿病には、インスリン分泌が著しく低下したことによって発症するインスリン依存型糖尿病(1型)と、インスリン分泌はある程度保たれているものの、なお不足しているインスリン非依存型糖尿病(2型)とがある。2型糖尿病患者の増加は特に著しく、40歳以上の人の10%が罹患していると言われている。わが国では糖尿病の90%以上がこの2型糖尿病患者である。2型糖尿病は、インスリン分泌不全とインスリン抵抗性による病態を特徴とする。2型糖尿病におけるインスリン作用不足は次の病因による。
- [0005] ・膵β細胞からのインスリン分泌不足  
・肝からの糖の放出の亢進  
・筋や脂肪組織など末梢組織でのインスリン抵抗性
- 2型糖尿病の発症に対して、インスリン抵抗性は大きく関与しているのみならず、高血圧、肥満、高脂血症などとの関連性も指摘されている。最近になって糖尿病予防・

治療においてインスリン抵抗性は特に重視されている。インスリン抵抗性は、血中にインスリンが存在していても、標的組織である肝、筋肉、脂肪組織などにおいて十分な作用が発現できない状態を意味している。インスリン抵抗性は、インスリンの感受性が低下し、正常なインスリン作用が阻害されているので、通常以上の量のインスリンを必要とする。肥満のない本態性高血圧患者においてインスリン感受性は30〜40%の低下と報告されており、肥満のある場合はさらに感受性は低下する。従って、インスリン抵抗性は本態性高血圧全体では50〜60%、肥満を伴う場合は70〜80%、空腹時中性脂肪高値を伴う場合は80%が認められるとされている。

- [0006] インスリン抵抗性には、遺伝因子のほか、肥満、糖尿病(特に肥満を伴ったインスリン非依存型糖尿病)、過食、運動不足、ストレス、妊娠、感染症、加齢、ステロイドの長期使用などの環境因子が関わっている。インスリン抵抗性は、インスリン受容体のインスリン結合能は正常だが、インスリン受容体遺伝子の異常などにより、細胞表面のインスリン受容体が高度に減少したり、チロシンキナーゼ活性が低下したために起こる。また、インスリン受容体に対する自己抗体が生じ、インスリン抵抗性を生じることもある。
- [0007] インスリン抵抗性の発現は、膵臓の $\beta$ -細胞からのインスリン過分泌という形で見られる。すなわち生体はインスリン抵抗性に打ち勝つために、インスリンを多量に分泌するので血中インスリン値が高くなり、一般に高インスリン血症が見られることが多い。
- [0008] インスリン抵抗性が加わっても、膵 $\beta$ -細胞のインスリン分泌予備能が十分であれば、代償性のインスリン分泌亢進によって作用の不足は起こらない。しかし、膵 $\beta$ -細胞側に何らかの障害があつて、インスリン分泌不足になると代償は困難となり、インスリンの作用不足が起こり高血糖をきたす。さらに高血糖が持続すると、高血糖が二次的に膵のインスリン分泌を抑制することになり、肝や筋でのインスリン作用も低下させ、インスリン抵抗性を増加させるなどの悪循環を起こす。
- [0009] インスリン抵抗性が長く続くと、高インスリン血症そのものが、インスリン受容体の数を減少させたり、受容体の $\beta$ -サブユニットのチロシンキナーゼ活性を低下させる。高インスリン血症自体がインスリン抵抗性を悪化させ、さらにインスリンの効果が低下することになる。

[0010] 従来開発されてきた経口抗糖尿病剤には以下のようなものがある(薬効分類:396)

。

[0011] 1.インスリン分泌促進剤:

1-aスルホニル尿素剤;トルブタミド(ヘキストラスチノン他)、クロルプロパミド(ダイヤビニーズ他)、アセトヘキサミド(ジメリン)、トラザミド(トリナーゼ)、グリクロピラミド(デアメルリンS)、グリベンクラミド(オイグルコン、ダオニール他)、グリクラジド(グリミクロン他)

1-bスルホニルアミド剤;グリブゾール(グルデアーゼ)

2.インスリン抵抗性改善剤:

2-aチアゾリジン剤;トログリタゾン(ノスカル)、ピオグリタゾン

2-bビグアナイド剤;ブホルミン(ジベトンS他)、トホルミン(グリコラン、メルヒケン)

3.食後過血糖改善剤:

3-a  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤;アカルボース(グルコバイ)、ボグリボース(ベイスン)

これら経口糖尿病薬には種々の問題点がある。スルホニル尿素剤は糖尿病と診断されたばかりの患者に最も普通に使われる薬剤であるが、運動療法や食事療法が不十分な場合、すい臓の疲弊を必要以上に早める。 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤は血糖値に対する影響が十分ではないという指摘がある。

[0012] 一方、チアゾリジン誘導体はスルホニル尿素剤のようにインスリン分泌刺激作用を介さず、膵の $\beta$ -細胞の機能を保ちつつ、生体のインスリン感受性を増強させて、糖尿病状態で亢進しているインスリン標的臓器でのインスリン抵抗性を改善して、末梢での糖利用を促進し、肝での糖放出を抑制して血糖低下作用を示す。

[0013] チアゾリジン誘導体はインスリン受容体のインスリン結合部以降に作用してインスリン抵抗性を軽減し、肝における糖産生を抑制し、末梢組織における糖利用を高め血糖を低下させる。この作用は、インスリン抵抗性の主因である細胞内インスリン情報伝達機構を正常化することによると推測されるが、その分子標的は完全には明らかになっていない。

[0014] また、糖尿病は複数の遺伝子変異、環境の問題が集積した疾患であり、症状は似ていても、その根本原因に個人差がある。糖尿病の遺伝素因として明らかになっている遺伝子にPPAR $\gamma$ 、 $\beta$ 3アドレナリン受容体、アディポネクチンがある。3者の異常は

それぞれインスリン抵抗性を増悪させる。抗糖尿病剤の分子標的を明らかにすることは、患者の遺伝情報に基づくオーダーメイド医療を開発するうえにおいても重要である。

非特許文献1: WY FUJIMOTO “The importance of insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus.” Am. J. Med., Apr 2000; 108 Suppl. 6a: 9S-14S

非特許文献2: M Diamant and RJ Heine “Thiazolidinediones in type 2 diabetes mellitus: current clinical evidence” Drugs, Jan 2003; 63(13): 1373-1405

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0015] しかしながら、チアゾリジン誘導体を始めとする抗糖尿病剤は、インスリン抵抗性に対して高い有効性を示すが、その薬理作用機序については明らかになっていないのが現状である。チアゾリジン誘導体等の抗糖尿病薬の薬理作用機序、特にチアゾリジン誘導体の分子標的が明らかになれば、さらに薬理作用の明らかな新規薬剤の開発が可能となる。

[0016] そこで、本発明は、上述したような実情に鑑み、チアゾリジン誘導体等の抗糖尿病薬の分子標的を明らかにし、新規抗糖尿病薬のスクリーニング方法を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0017] 上述した目的を達成するために本発明者らが鋭意検討した結果、チアゾリジン誘導体の分子標的となるタンパク質を同定することができ、当該タンパク質を用いた新規なスクリーニング方法を開発することができ、本発明を完成するに至った。

[0018] すなわち、本発明は以下を包含する。

[0019] (1) 以下の(a)又は(b)に示され、抗糖尿病剤の標的タンパク質。

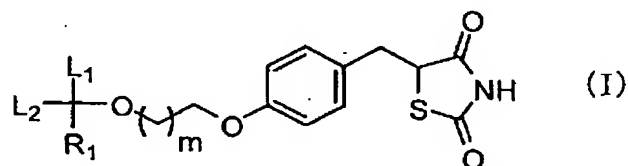
[0020] (a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、抗糖尿病剤と相互作用するタンパク質

- (2) 上記抗糖尿病剤はチアゾリジン誘導体であることを特徴とする(1)記載の標的タンパク質。
- [0021] (3) 上記チアゾリジン誘導体はピオグリタゾンであることを特徴とする(2)記載の標的タンパク質。
- [0022] (4)  $\gamma$  チュブリン・リング複合体タンパク質であることを特徴とする(1)記載の標的タンパク質。
- [0023] (5) 以下の(a)又は(b)に示され、抗糖尿病剤の標的タンパク質をコードする遺伝子。
- [0024] (a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質  
(b) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、抗糖尿病剤と相互作用するタンパク質  
(6) 上記抗糖尿病剤はチアゾリジン誘導体であることを特徴とする(5)記載の標的タンパク質をコードする遺伝子。
- [0025] (7) 上記チアゾリジン誘導体はピオグリタゾンであることを特徴とする(6)記載の標的タンパク質をコードする遺伝子。
- [0026] (8) 上記標的タンパク質は $\gamma$  チュブリン・リング複合体タンパク質であることを特徴とする(5)記載の標的タンパク質をコードする遺伝子。
- [0027] (9) スクリーニング候補物質を以下の(a)又は(b)に示すタンパク質に接触させる工程と、  
(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質  
(b) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、抗糖尿病剤と相互作用するタンパク質  
上記候補物質と上記タンパク質との相互作用を検出する工程と、  
を備える抗糖尿病剤のスクリーニング方法。
- [0028] (10) 上記抗糖尿病剤はチアゾリジン誘導体であることを特徴とする(9)記載の抗糖尿病剤のスクリーニング方法。

- [0029] (11) 上記チアゾリジン誘導体はピオグリタゾンであることを特徴とする(10)記載の抗糖尿病剤のスクリーニング方法。
- [0030] (12) 上記標的タンパク質は $\gamma$  チューブリン・リング複合体タンパク質であることを特徴とする(9)記載の抗糖尿病剤のスクリーニング方法。
- [0031] (13) (9)乃至(12)いずれか1記載のスクリーニング方法によってスクリーニングされ、上記タンパク質と相互作用を示す物質を主成分とする抗糖尿病剤。
- [0032] (14) 一般式(I)

[化1]



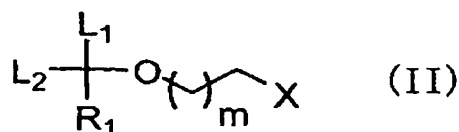
- [0033] (上記式(I)中、 $R_1$ は、水素、炭素数1～10のアルキル基、炭素数3～7のシクロアルキル基、炭素数7～11のフェニルアルキル基、フェニル基、窒素、酸素及び硫黄からなる群から選ばれる1又は2のヘテロ原子を含む5又は6員環のヘテロ環である。 $L_1$ 及び $L_2$ は、同一又は異なり、それぞれ水素又は炭素数1～3のアルキル基であるか、若しくは、一緒になって炭素数2～6のシクロアルキル基を形成する。 $m$ は1～5のいずれかの整数を表す。)で表されるチアゾリジン誘導体。
- [0034] (15) 上記式(I)中、 $L_1$ 及び $L_2$ は、一緒になって形成する炭素数2～6のシクロアルキル基であることを特徴とする(14)記載のチアゾリジン誘導体。
- [0035] (16) 上記式(I)中、 $R_1$ は水素であり、 $L_1$ 及び $L_2$ は一緒になって形成する炭素数2～6のシクロアルキル基であることを特徴とする(14)記載のチアゾリジン誘導体。
- [0036] (17) 上記式(I)中、 $R_1$ は炭素数1～10のアルキル基であり、 $L_1$ 及び $L_2$ は一緒になって形成する炭素数2～6のシクロアルキル基であることを特徴とする(14)記載のチアゾリジン誘導体。
- [0037] (18) 5-[4-[2-(1-メチル-シクロヘキシルオキシ)-エトキシ]-ベンジル]-チアゾリジン-2,4-ジオンであることを特徴とする(14)記載のチアゾリジン誘導体。
- [0038] (19) (14)乃至(18)いずれか1記載のチアゾリジン誘導体の薬理上許容される塩。

[0039] (20) (14)乃至(18)いずれか1記載のチアゾリジン誘導体及び/又はその薬理上許容される塩を有効成分として含有する医薬組成物。

[0040] (21) 抗糖尿病剤であることを特徴とする(20)記載の医薬組成物。

[0041] (22) 一般式(II)

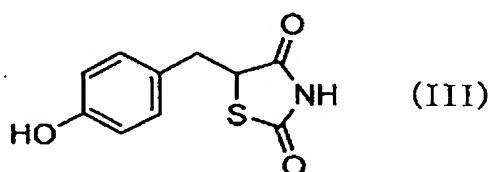
[化2]



[0042] (上記式(II)中、 $\text{R}_1$ は、水素、炭素数1～10のアルキル基、炭素数3～7のシクロアルキル基、炭素数7～11のフェニルアルキル基、フェニル基、窒素、酸素及び硫黄からなる群から選ばれる1又は2のヘテロ原子を含む5又は6員環のヘテロ環である。 $\text{L}_1$ 及び $\text{L}_2$ は、同一又は異なり、それぞれ水素又は炭素数1～3のアルキル基であるか、若しくは、一緒になって炭素数2～6のシクロアルキル基を形成する。 $m$ は1～5のいずれかの整数を表す。 $\text{X}$ は $\text{MeSO}_2$ 、 $p$ -toluenesulfonyl、ヨウ素、臭素、塩素及び水酸基からなる群から選ばれる一種である。)

で表される化合物と、一般式(III)

[化3]



[0043] で表される化合物とを縮合反応させる、チアゾリジン誘導体の製造方法。

### 発明の効果

[0044] 本発明によれば、新規抗糖尿病剤のスクリーニングに使用することができる標的タンパク質及び当該タンパク質をコードする遺伝子を提供することができる。また、本発明によれば、当該標的タンパク質を用いることによって、抗糖尿病剤のスクリーニング方法を提供することができる。

[0045] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2003-402164号の明細書

および/または図面に記載される内容を包含する。

### 図面の簡単な説明

[0046] [図1]ピオグリタゾンとFLJ14797由来タンパク質との相互作用解析の結果を示す特性図である。

[図2]配列番号2に示すアミノ酸配列とNP\_055259.1のアミノ酸配列とのアライメントを示す図である。

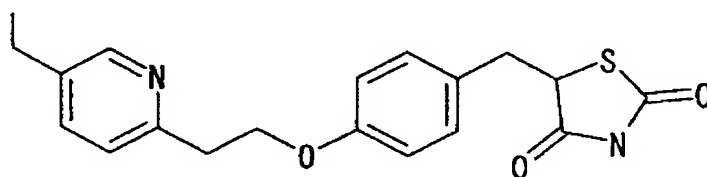
### 発明を実施するための最良の形態

[0047] 以下、本発明を詳細に説明する。

#### [0048] チアゾリジン誘導体に対して相互作用を示すタンパク質

本発明に係るタンパク質は、抗糖尿病剤に対して相互作用を示すタンパク質である。このタンパク質は、特に、抗糖尿病薬の一種であるチアゾリジン誘導体(具体的にはピオグリタゾン)に対する相互作用を示す。ピオグリタゾンの構造式を以下に示す。

[化4]



[0049] 本発明に係るタンパク質と相互作用を示す抗糖尿病剤としては、チアゾリジン誘導体を挙げることができる。チアゾリジン誘導体としては、上記構造式に類似の構造式を有し、ピオグリタゾンと同様な薬理作用を有する化合物を挙げることができる。但し、タンパク質が相互作用を示すチアゾリジン誘導体としては、ピオグリタゾンに限定されず、例えばロシグリタゾン、トログリタゾン、シグリタゾン等を例示することができる。

[0050] 本発明に係るタンパク質は、例えば、配列番号2に表すアミノ酸配列を有するタンパク質である。ここで、本発明に係るタンパク質としては、配列番号2に表すアミノ酸配列からなるタンパク質に限定されず、配列番号2に表すアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は置換されたアミノ酸配列からなり、且つ、チアゾリジン誘導体に対して相互作用を示すタンパク質も含んでいる。

[0051] アミノ酸の置換、欠失あるいは挿入の数及び部位は、その機能が保持される限り制

限はないが、具体的には、配列番号2に表すアミノ酸配列において、1〜30個、好ましくは1〜10個、さらに好ましくは1〜5個のアミノ酸が置換、欠失あるいは挿入されたアミノ酸配列であってもよい。

[0052] また、本発明に係るタンパク質としては、配列番号2に表すアミノ酸配列において、50%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有するアミノ酸配列から構成され、且つ、チアゾリジン誘導体に対して相互作用を示すタンパク質であっても良い。ここで、上記相同性の数値は、配列解析ソフトウェアであるDNASIS(日立ソフトウェアエンジニアリング)を用いて、例えば、マキシムマッチング法のコマンドを実行することにより求められる。その際のパラメータは、デフォルトの設定(初期設定)とする。

[0053] なお、配列番号2に表されるタンパク質は、NEDO(新エネルギー・産業技術総合開発機構)タンパク質cDNA構造解析プロジェクト([Http://www.nedo.go.jp/bip/](http://www.nedo.go.jp/bip/))においてFLJ14797として登録されたcDNAにコードされ、Swiss-Prot Q9USQ2、GenBank AAH09870.1及びRefSeq NP\_055259.1と高い相同性(93%)を示す。配列番号2に示すアミノ酸配列とNP\_055259.1のアミノ酸配列とのアライメントを図2に示す。

AAH09870.1及びRefSeq NP\_055259.1は、 $\gamma$  チュブリン・リング複合体タンパク質GCP4遺伝子として知られている(Fava, F et al., Human 76p: A new member of the gamma-tubulin-associated protein family, J. Cell Biol. 147(4), 857-868 (1999))。したがって、本発明に係るタンパク質もまた、 $\gamma$  チュブリン・リング複合体タンパク質GCP4と機能的に非常に類似性の高いタンパク質であると考えられる。なお、本発明に係るタンパク質をコードする遺伝子については、WO0204514に公開されているが、その機能については未知であり、本発明の以前においてはチアゾリジン誘導体に対する相互作用を示すタンパク質をコードする遺伝子であることは知られていない。

[0054] 一方、本発明に係る遺伝子、すなわち、本発明に係るタンパク質をコードするcDNA(FLJ14797)の塩基配列としては、例えば、配列番号1に示す塩基配列を挙げることができるが、この塩基配列に限定されるものではない。例えば、配列番号1に示す塩基配列において、配列番号2に示すアミノ酸配列をコードするようにコドンを変更させた塩基配列であっても良い。また、配列番号1に示すアミノ酸配列をコードする塩基

配列と相補的な塩基配列に対してストリンジントな条件でハイブリダイするような塩基配列からなり、且つチアゾリジン誘導体に対して相互作用を示すタンパク質をコードする塩基配列も本発明に係る遺伝子に含まれる。

[0055] ここで、「ストリンジントな条件下でハイブリタイズする」とは、例えば、6×SSC、0.5%SDS及び50%ホルムアミドの溶液中で42℃にて加温した後、0.1×SSC、0.5%SDSの溶液中で68℃にて洗浄する条件でも依然として陽性のハイブリタイズのシグナルが観察されることを表す。

[0056] チアゾリジン誘導体と本発明に係るタンパク質との相互作用

以下、チアゾリジン誘導体と本発明に係るタンパク質の相互作用について説明する。

[0057] 糖尿病におけるインスリン作用の不足の原因は、膵臓からのインスリン分泌量の低下、及び肝臓や筋肉におけるインスリン感受性の低下(インスリン抵抗性)の二つの機序に大別されるが、肝臓や筋肉におけるインスリン作用は以下のような細胞内機構に基づく。すなわち、インスリンが細胞表面のインスリン受容体に結合するとチロシンキナーゼが活性化され、インスリン受容体の自己リン酸化が起こる。さらに、インスリン受容体のリン酸化チロシンに細胞内基質であるIRS-1が結合し、インスリン受容体によってIRS-1のチロシンがリン酸化される。次にIRS-1のリン酸化チロシンにPI3キナーゼが結合し、活性化される。活性化されたPI3キナーゼは、PIをPI(3)Pに、PI(4)PをPI(3,4)P2及びPI(3,4,5)P3にリン酸化する。

[0058] PI3キナーゼによる細胞内シグナルは、たとえばGLUT4を含む小胞に伝えられ、GLUT4が細胞表面にトランスロケートされてグルコースの細胞内への取り込みが促進されるものと考えられている。一方、Kapellerら(JBC, Vol. 270, pp.25985-25991, 1995)及びInukaiら(Biochem. J. Vol. 346, pp.483-489, 2003)はヒトA431細胞あるいはCHO細胞を用いた実験ではあるが、インスリン刺激により、PI3キナーゼがγチュブリンと結合することを報告している。γチュブリンは小さなチュブリンを含み中心体に多く局在している。中心体はほぼすべての動物細胞に存在する微小管形成中心であり、細胞周期の間期には核膜の外側に接して存在しているが、間期に倍加、二等分され、有糸分裂の開始時に両側に移動して紡錘体のふたつの極になる。Kapeller

らは、PI3キナーゼがインスリン刺激による微小管形成を介して、脂肪細胞等の分化増殖に影響する可能性を示唆している。

[0059] 上述したように、本発明に係るタンパク質は、 $\gamma$  チュブリン・リング複合体タンパク質GCP4と機能的に非常に類似性の高いタンパク質であると考えられるため、チアゾリジン誘導体が結合することにより、 $\gamma$  チュブリンとPI3キナーゼの結合を増強する可能性が考えられる。

[0060] 一方、チアゾリジン誘導体がペルオキシソーム増殖薬活性化受容体、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  のリガンドとなる可能性がしめされて以来、これらのインスリン感受性改善薬がPPAR  $\gamma$  を介するどのような機構で薬理作用を発現するのかに注目が集まっている。PPARは核内ホルモン受容体スーパーファミリーのひとつであり、リガンドの結合により活性化されるとretinoid-X-receptor- $\alpha$  (RXR  $\alpha$ )と複合体を形成し、転写因子として標的遺伝子上流にある特異的応答配列(peroxisome proliferator responsive element, PPRE)に結合して遺伝子の発現を誘導する。PPARの名称の由来となったペルオキシソーム増殖薬(PP)とは、細胞内顆粒ペルオキシソームを増殖させるという共通した作用を持つ一群の化学物質につけられた総称である。発見当初、PPARはPPの多面的な効果(ペルオキシソーム増殖、酵素誘導、発癌)を仲介する受容体と考えられたが、リガンド探索、標的遺伝子探索を含むその後の広範な研究から、脂質代謝を含む多くの生理機能の重要な調節因子であることが明らかになってきた。

[0061] PPARにはサブタイプがあり、PPAR  $\alpha$ 、PPAR  $\beta$  (PPAR  $\delta$  あるいはNUC1とも呼ばれる)及びPPAR  $\gamma$  (転写開始点と alternative splicing の違いによりPPAR  $\gamma$  1及びPPAR  $\gamma$  2がある)と呼ばれている。ある化学物質(リガンド)がPPARを活性化させる能力はサブタイプによって異なり、しかも各サブタイプの発現は組織により大きく異なる。PPAR  $\alpha$  は肝臓、心筋、腸及び腎近位尿細管での発現が高い。PPAR  $\beta$  は広い組織に発現しており、 $\alpha$  及び $\gamma$  よりもそのレベルが高い場合もある。PPAR  $\gamma$  は主に脂肪組織及び免疫系で発現している。こうした組織分布の違いは、PPARサブタイプが異なる生理的役割を持つことを示唆している。

[0062] PPARの標的遺伝子が明らかになるにつれ、PPAR  $\alpha$  が主に肝臓及び心筋などにお

ける脂質酸化に関わる種々の遺伝子の発現を制御することが分かって来た。一方、PPAR $\gamma$ は脂肪組織に高発現しており、白色脂肪組織における脂肪細胞分化終末における転写因子としての機能を持っている。PPAR $\gamma$  2は脂肪細胞の脂肪酸結合タンパクAP2をtrans activateする特異的転写因子 ARF-6の1成分としてクローニングされた。またPPAR $\gamma$  2/RXR $\alpha$ はホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(PEPCK)の脂肪細胞特異的発現を誘導してグリセロール生成をもたらす。AP2及びPEPCKの両遺伝子は脂肪細胞分化終末の指標であり、PPAR $\gamma$ によりそれらが制御されることは、この受容体が脂肪細胞の表現型維持に重要な役割を果たすことを示している。しかしながら、チアゾリジン誘導体とPPAR $\gamma$ を直接結びつける明確な機構はまだ良く分かっていない。また、CBP[cAMP response element binding protein (CREB)binding protein]のヘテロ欠損マウスが、PPAR $\gamma$ ヘテロ欠損マウス以上に強い抗肥満・抗糖尿病の表現型を呈することから、PPAR $\gamma$ 非依存性の抗肥満・抗糖尿病の新規な情報伝達経路が存在することが示唆されている。

[0063] 一方、脂肪細胞組織特異的に高発現する遺伝子の産物として発見されたアディポネクチンの欠乏も、肥満、2型糖尿病のインスリン抵抗性の重要な原因のひとつであると考えられている。これはインスリン感受性が良好なPPAR $\gamma$ ヘテロ欠損マウスでアディポネクチンの発現が亢進していること、及びアディポネクチン遺伝子は日本人の2型糖尿病の主要な疾患感受性遺伝子であることに基づくものである。アディポネクチンは白色脂肪細胞由来の主要なインスリン感受性ホルモンであり、アディポネクチンを補充することにより、脂肪萎縮性糖尿病のインスリン抵抗性が改善される。2型糖尿病患者ではアディポネクチン不足によりインスリン抵抗性が惹起され、アディポネクチンの補充によりインスリン抵抗性が改善されるものと考えられる。また、アディポネクチンホモ欠損マウスは耐糖能低下を示すことから、アディポネクチンは生体内で抗糖尿病因子として作用していると予想される。さらに、インスリン抵抗性を呈する脂肪萎縮性糖尿病マウスやKKAYマウスへのアディポネクチンの投与実験、あるいは肥満・インスリン抵抗性のモデルマウスであるob/obマウスとアディポネクチン過剰発現トランスジェニックマウスとの掛け合わせ実験において、アディポネクチンを投与すると脂肪酸燃焼やエネルギー浪費に関わる因子の発現が増加する。これは、これらの遺伝子

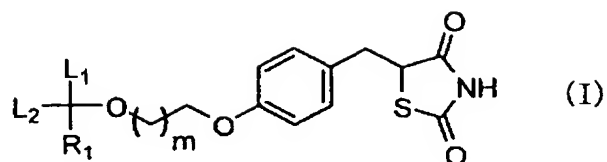
を標的とするPPAR $\alpha$ の発現量、及びPPAR $\alpha$ の内因性リガンド活性自体がアディポネクチン投与により増加することによる可能性が報告されている(山内ら、分子糖尿病学の進歩—基礎から臨床まで—2003、pp.97-106、金原出版)。

- [0064] 一方、Surapureddiら(PNAS, Vol. 99, pp.11836-11841, 2002)は、ラットの肝組織抽出液を用い、PRIC複合体と呼ばれるコアクチベータがPPAR $\alpha$ と結合してその作用を増強すること、さらにGSTタグをつけたPPAR $\alpha$ をバイトとしたプルダウンアッセイにより、PRIC複合体のなかでもTOGとよばれるチュブリン結合タンパク質がPPAR $\alpha$ と結合することを見出している。また、Spittleら(JBC, Vol. 275, pp.20748-20753, 2000)は、TOGタンパク質は $\gamma$ チュブリンリング複合体と非常に類似した微小管構造に結合することを報告している。
- [0065] これらの情報と本発明者らの結果を総合すると、ピオグリタゾン $\gamma$ チュブリン・リング複合体との結合を介して $\gamma$ チュブリン・リング複合体-TOG-PPAR $\alpha$ の3者間の相互作用を増強することにより、アディポネクチンの作用をミミックして2型糖尿病患者のインスリン抵抗性を改善する可能性が考えられる。またあるいは、PPAR $\gamma$ に対してもTOGタンパク質に類似のタンパク質が存在すると想定した場合、ピオグリタゾンが $\gamma$ チュブリン・リング複合体-TOG-PPAR $\gamma$ の3者間の相互作用を亢進して、PPAR $\gamma$ を活性化する可能性も考えられる。
- [0066] 以上のように、本発明者らは、チアゾリジン誘導体の分子標的のひとつが $\gamma$ チュブリン・リング複合体であり、チアゾリジン誘導体が $\gamma$ チュブリンリング複合体との結合を介して、PI3キナーゼのシグナル及び/又はPPAR $\alpha$ の作用を増強することにより、インスリン感受性を向上させ、インスリン抵抗性に対する治療効果を示す可能性があることを見出した。
- [0067] 本発明に係るタンパク質を用いたスクリーニング方法
- 以上説明したように、チアゾリジン誘導体と本発明に係るタンパク質との相互作用から、本発明に係るタンパク質を使用して、新規抗糖尿病薬のスクリーニング方法を確立することができる。
- [0068] スクリーニング方法は、上述した本発明に係るタンパク質に対してスクリーニング候補物質を接触させる工程の後、当該候補物質と当該タンパク質との相互作用の有無を

検出する工程とを備える。

- [0069] スクリーニング候補物質としては特に限定されないが、各種の低分子化合物、タンパク質を挙げることができる。
- [0070] スクリーニング候補物質と本発明に係るタンパク質とを接触させる方法としては、特に限定されず、候補物質と対象物質との二分子間の相互作用を解析する方法と知られる如何なる方法も使用することができる。例えば、表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance: SPR) の原理を応用したリアルタイムでの相互作用解析を行う装置、例えば、Biacore 3000 (ビアコア社製) 等を使用する方法や、非修飾かつ非固定で2種の分子間相互作用を分析する手法として、クロマトグラフィーを用いた手法 (米国特許公報4,762,617) を挙げることができる。さらに、Y. Dunayevskiy et al., Rapid Comm. Mass Spectrometry, vol.11, 1178-1184 (1997) に記載された方法や、F.J. Moy et al., Anal. Chem., vol.73, 571-581 (2001) に記載された方法、国際公開公報WO 00/47999 に記載された方法、特許公表公報第2002-508515号に記載された方法、特許公表公報第2003-502665号に記載された方法を適宜使用することができる。
- [0071] また、水晶発振子等のその他の表面プラズモン共鳴法、Coupled waveguide プラズモン共鳴法、二面偏波式干渉法、カロリメトリー法、遠心沈降法、キャピラリー電気泳動法、エナジートランスファー法、蛍光偏向法、蛍光相関分析法、プロテインチップ、化合物チップ等の方法も適宜使用することができる。
- [0072] 本スクリーニング方法によって、本発明に係るタンパク質と間で相互作用を有すると判断された候補物質は、チアゾリジン誘導体と同様な薬理作用機序を有する新規な抗糖尿病薬としてスクリーニングされたこととなる。
- [0073] スクリーニングされた新規化合物
- 上記スクリーニング方法によって、抗糖尿病薬の候補物質として下記一般式(I)で表されるチアゾリジン誘導体を同定した。なお、下記一般式(I)で表される化合物は新規物質である。

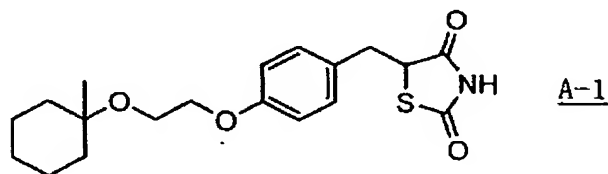
[化5]



[0074] (上記式(I)中、 $R_1$ は、水素、炭素数1～10のアルキル基、炭素数3～7のシクロアルキル基、炭素数7～11のフェニルアルキル基、フェニル基、窒素、酸素及び硫黄からなる群から選ばれる1又は2のヘテロ原子を含む5又は6員環のヘテロ環である。 $L_1$ 及び $L_2$ は、同一又は異なり、それぞれ水素又は炭素数1～3のアルキル基であるか、若しくは、一緒になって炭素数2～6のシクロアルキル基を形成する。 $m$ は1～5のいずれかの整数を表す。)

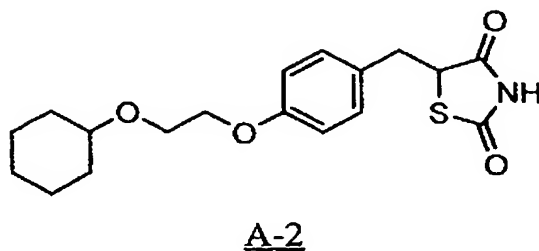
具体的に上記一般式(I)で表される化合物としては、例えば、下記式A-1で表される5-[4-[2-(1-メチルシクロヘキシルオキシ)エチロキシ]ベンジル]チアゾリジン-2,4-ジオンを挙げることができる

[化6]

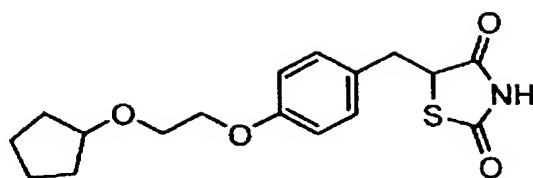


[0075] また、上記式(I)で表される化合物としては、上記A-1に限定されず、下記式A-2及びA-3を例示することができる。

[化7]

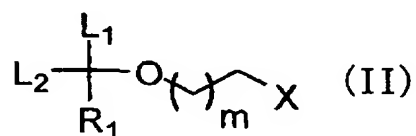


[化8]

A-3

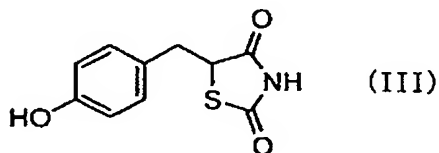
[0076] 上記式(I)で表される化合物は、下記式(II)

[化9]



[0077] (上記式(II)中、 $R_1$ 、 $L_1$ 及び $L_2$ は上記式(I)と同じ定義である。Xは $\text{MeSO}_2$ 、*p*-toluenesulfonyl、ヨウ素、臭素、塩素及び水酸基からなる群から選ばれる一種である。)で表される化合物と、下記式(III)

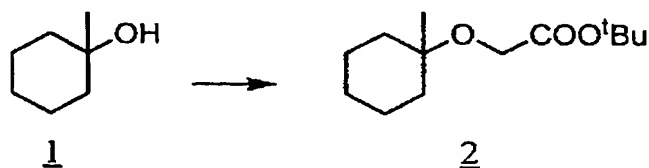
[化10]



[0078] で表される化合物とを縮合反応させることで製造することができる。

[0079] 例えば上記のA-1で表される化合物の製造方法を説明する。先ず、以下のようにして(1-メチル-シクロヘキシル)-tert-酢酸ブチルエステル(2)を合成する。

[化11]

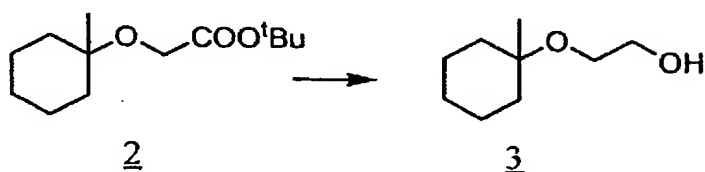


[0080] 具体的には、窒素雰囲気下、氷冷した水素化ホウ素ナトリウム(油性;60wt% 300mg)を含むTHF/DMF(5/1)混液40mLの懸濁溶液へ、化合物(1)(713mg、6.2mmol)を攪拌しながらゆっくりと加え、その後10分間攪拌する。続いて氷浴を取り除き、室温で

30分間攪拌する。攪拌収量後再び氷冷する。次に、ブromo酢酸t-ブチルエステル(2.25mL、15.5mmol)を加える。添加終了後、氷浴を取り除き、室温にて2時間攪拌する。その後、再び氷冷し、反応液へ水(1mL)をゆっくりと加える。反応液へ水、酢酸エチルを注ぎ、良く攪拌した後、有機相を集める。さらに酢酸エチルから抽出する。有機相を集め、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下ろ過濃縮後シリカゲルカラムクロマトグラフにより精製し、化合物(2) ( $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$ : 1.28-1.38(13H, m), 1.40(9H, s), 4.02(2H, s))を合成することができる。

[0081] 次に、以下のようにして、化合物(2)から2-(1-メチル-シクロヘキシル)-エタノール(3)を合成する。

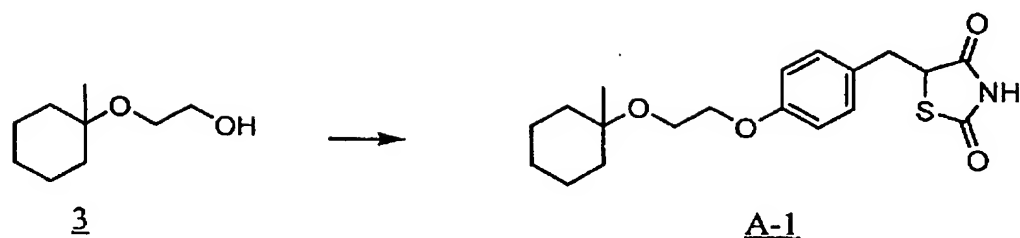
[化12]



[0082] 具体的には、窒素雰囲気下、氷冷した水素化アルミニウムリチウム(304mg、8mmol)を含むTHF懸濁溶液4mLに、化合物(2)(254mg、2mmol)のTHF溶液2mLを攪拌しながらゆっくりと加える。添加終了後、反応容器を60℃に加温し、2時間攪拌する。攪拌終了後、再び氷冷し、反応液へ飽和硫酸ナトリウム水溶液を水素の発生がなくなるまでゆっくりと加える。セライト上で残渣をろ過し、残渣を酢酸エチルで洗浄する。ろ液と洗浄液を合わせ、減圧下濃縮する。粗精製品をシリカゲルカラムクロマトグラフにより精製することで化合物(3) ( $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$ : 1.28-1.38(13H, m), 3.50-3.75(4H, m))を合成することができる。

[0083] 次に、以下のようにして、化合物(3)から5-[4-[2-(1-メチル-シクロヘキシルオキシ)-エトキシ]-ベンジル]-チアゾリジン-2,4-ジオン(A-1)を合成する。

[化13]



[0084] 具体的には、窒素雰囲気下、化合物(3) (158mg、1.0mmol)のトルエン(2mL)溶液にトリブチルホスフィン(234mg、1.1mmol)を加え、20分間攪拌する。続いて、この溶液を、5-(4-ヒドロキシ-ベンジル)-チアゾリジン-2,4-ジオン(246mg、1.1mmol)と1,1'-アゾビス(N,N'-ジメチルホルムアミド)(200mg、1.1mmol)とを含むトルエン(2mL)溶液に室温にて加え、終夜攪拌する。攪拌終了後、さらに酢酸エチルを加え、残渣をセライト上でろ別する。残渣を更に酢酸エチルで洗浄し、ろ液と洗浄液を合わせる。減圧下濃縮し、粗精製品をシリカゲルカラムクロマトグラフにより精製することで、化合物(A-1) ( $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$ : 1.28-1.38(13H, m), 3.46 (2H, d), 3.79 (2H, t), 4.11(2H, t), 4.13 (1H, t), 6.72 (2H, d), 7.00 (2H, d))を合成することができる。

[0085] なお、出発原料として化合物(1)の代わりにシクロヘキサノールを使用する以外は、上述した合成方法と同様に各反応を行うことによって、上述した化合物A-2 ( $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$ : 1.28-1.42(10H, m), 2.85 (1H, m), 3.46 (2H, d), 3.79 (2H, t), 4.11(2H, t), 4.13 (1H, t), 6.70 (2H, d), 7.00 (2H, d))を合成することができる。また、出発原料としてシクロペンタノールを使用する以外は、上述した合成方法と同様に各反応を行うことによって、上述した化合物A-3 ( $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$ : 1.51-1.60(8H, m), 2.85 (1H, m), 3.46 (2H, d), 3.79 (2H, t), 4.11(2H, t), 4.10(1H, t), 6.72 (2H, d), 7.00 (2H, d))を合成することができる。

[0086] 一方、上記一般式(I)で表される新規化合物は、薬理上許容される塩としてもよい。「薬理上許容される塩」としては、例えば塩酸、硫酸、硝酸又はリン酸等の無機酸の塩；パラトルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、シュウ酸又はクエン酸等の有機酸の塩；アンモニウム、トリメチルアンモニウム又はトリエチルアンモニウム等の有機塩基の塩；ナトリウム又はカリウム等のアルカリ金属の塩；ヨウ化メチル、ヨウ化エチル等のハロゲン化アルキルとの四級塩；及びカルシウム又はマグネシウム等のアルカリ土類金属の

塩等を挙げることができる。新規化合物(I)としては、その水和物を含む意味であり、化合物(I)に対して任意の数の水分子を配位していてもよい。また、新規化合物(I)としてはそのプロドラッグを含み意味である。プロドラッグとは、生体内で代謝的に分解される基を有する新規化合物(I)の誘導体であり、生体内での代謝過程により、新規化合物(I)に変換されることで薬理作用を発現する化合物である。適当なプロドラッグ誘導体を選択する方法及び製造する方法は、例えばDesign of Prodrugs, Elsevier, Amsterdam 1985に記載されている。

- [0087] 例えば、新規化合物(I)がカルボキシを有する場合は、当該カルボキシと適当なアルコールを反応させることによって製造されるエステル誘導体、又は当該カルボキシと適当なアミンを反応させることによって製造されるアミド誘導体のようなプロドラッグが例示される。例えば、新規化合物(I)がヒドロキシを有する場合は、例えば当該ヒドロキシと適当なアシルハライド又は適当な酸無水物とを反応させることに製造されるアシルオキシ誘導体のようなプロドラッグが例示される。例えば、新規化合物(I)がアミノを有する場合は、そのアミノと適当な酸ハロゲン化物又は適当な混合酸無水物とを反応させることにより製造されるアミド誘導体のようなプロドラッグが例示される。
- [0088] 新規化合物(I)が不斉炭素原子を有する場合には、ラセミ体、両対掌体及び全ての立体異性体(ジアステレオマー)を含む。また、新規化合物(I)が二重結合を有する場合には、二重結合の置換基配置につき、幾何異性体が存在するときはそのいずれをも含む。
- [0089] 以上のような新規化合物(I)は、新規な抗糖尿病薬として作用を有する医薬組成物となる。当該医薬組成物を抗糖尿病薬として投与する場合、経口的、非経口的のいずれの方法でも投与することができる。経口投与は常法に従って錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、丸剤、液剤、シロップ剤、バツカル剤又は舌下剤等の通常用いられる剤型に調製して投与すればよい。非経口投与は、例えば筋肉内投与、静脈内投与等の注射剤、坐剤、経皮吸収剤、吸入剤等、通常用いられるいずれの剤型でも好適に投与することができる。
- [0090] また、当該医薬組成物の有効量に対して、剤型に適した賦形剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、滑沢剤、希釈剤等の各種医薬用添加剤とを必要に応じて混合し医薬製剤と

することができる。注射剤の場合には適当な担体と共に滅菌処理を行なって製剤とすればよい。具体的には、賦形剤としては乳糖、白糖、ブドウ糖、デンプン、炭酸カルシウムもしくは結晶セルロース等、結合剤としてはメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンもしくはポリビニルピロリドン等、崩壊剤としてはカルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末もしくはラウリル硫酸ナトリウム等、滑沢剤としてはタルク、ステアリン酸マグネシウムもしくはマクロゴール等が挙げられる。坐剤の基剤としてはカカオ脂、マクロゴールもしくはメチルセルロース等を用いることができる。また、液剤もしくは乳濁性、懸濁性の注射剤として調製する場合には通常使用されている溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、安定化剤、保存剤、等張剤等を適宜添加しても良く、経口投与の場合には矯味剤、芳香剤等を加えても良い。

- [0091] 新規化合物(I)の抗糖尿病薬としての投与量は、患者の年齢、体重、疾病の種類や程度、投与経路等を考慮した上で設定することが望ましいが、成人に経口投与する場合、通常1〜100mg/kg/日であり、好ましくは5〜30mg/kg/日の範囲内である。非経口投与の場合には投与経路により大きく異なるが、通常0.1〜10mg/kg/日であり、好ましく1〜5mg/kg/日の範囲内である。これを1日1回〜数回に分けて投与すれば良い。

### 実施例

- [0092] 以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

- [0093] [参考例1] ヒト完全長cDNAクローンからのタンパク質発現方法

#### 1. 発現プラスミドの作成

ヒト完全長cDNAクローンの目的遺伝子に対して、InvitrogenのGatewayシステムを用いキットのプロトコールに従い、PCRクローニングベクターGatewaypDONR201とBP反応を行うことによりエントリーベクターを得た。Gatewayシステムのデスティネーションベクターとしては、東洋紡績(株)の小麦胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成システム(PROTEIOS)に適応するpEU3-NII(東洋紡績)を基にして、Gatewayシステムが利用できるようGateway組換え配列を有するGatewayカセットを導入し、さらに発

現タンパク質のN末端領域にヒスチジンタグとFLAGタグ配列を有するペプチドが発現するようにPCR法を用いて改変したダブルタグデスティネーションベクターを作成した。

[0094] 作成したダブルタグデスティネーションベクターとエントリーベクターを用い、InvitrogenのGatewayシステムを用いプロトコールに従いBP反応を実施し、大腸菌コンピテントセルDH5  $\alpha$  に形質転換し、発現ベクターが導入されたクローンを選択した。得られたクローンからQIAfilter Midi kit (キアゲン)を用いて、キットのプロトコールに従ってプラスミドを調製した。得られたプラスミドは、PROTEIOS (東洋紡績) のプロトコールに従い、フェノール・クロロホルム処理を行いRNA分解酵素の不活化処理を施し、精製発現プラスミドを得た。

[0095] 2. 精製タンパク質の取得

東洋紡績(株)の小麦胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成システム (PROTEIOS) により組換えタンパク質を合成した。上記1. に記載した方法で取得した発現プラスミドからPROTEIOSのプロトコールに従いmRNAを作成した。取得したmRNAを20  $\mu$  g使用し、96穴マイクロタイタープレートの2穴分でPROTEIOSのプロトコールに従いタンパク質を合成させた。合成したタンパク質は、高速遠心分離処理により沈殿を除去し、取得した可溶性の画分を抗FLAGタグ抗体を固定化したANTI-FLAG M2 Affinity Gel (SIGMA社)を用い、プロトコールに従い精製を行い、精製タンパク質を得た。

[0096] [参考例2] ビアコアを用いたヒトタンパク質-医薬品相互作用における結合解離定数の決定方法

ビアコア社市販のS51用CM5センサーチップを1M EDC, 1.33M NHS及び16mg/ml AB-NTA(pH9.2)を用いてセンサーチップ表面のNTA化を施し、S51用NTAセンサーチップとした。これに小麦胚芽系で発現させ、FLAG tagで精製した蛋白質を固定化した。固定化は、0.5M  $\text{NiCl}_2$ 、0.4M EDC、0.1M EDC、リガンド溶液(蛋白質)、1M Ethanolamine、pH8.5を順次、Biacore S51の流路系にインジェクションして行った。固定化の際のRunning BufferはPBS (pH7.4)を用いた。リガンドが固定化されたセンサーチップを用いて以下のAssayを行った。Running BufferとしてHBS(10mM HEPES、

150mM NaCl, pH7.6)、0.005%  $P_2O_5$ 、100uM mineral ion cocktail( $Ca(OAc)_2$ 、 $Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$ 、 $Cu(OAc)_2 \cdot H_2O$ 、 $Co(OAc)_2 \cdot 4H_2O$ 、 $Mn(OAc)_2 \cdot 4H_2O$ 、 $Mg(OAc)_2 \cdot 4H_2O$ 、 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ )にDMSOを final 5%になるように加えて調製したものをを用いた。測定化合物は 62.5uM〜0.244uMまで1/2希釈ずつ9point調製した。溶媒の組成がRunning Bufferと同様になるように調製し、0濃度測定として化合物の含まれていない溶媒だけのものを調製した。また、化合物溶液、Running Buffer中に含まれるDMSOの効果の補正(solvent correction)として、3.8-5.1%のDMSO(8point)を含むRunning Bufferと同様の溶液を調製し、これらの測定結果をもとにして補正を行った。Biacore S51の Compound Characterization Assayプログラムを実施し、固定化されたりガンド(蛋白質)とアナライト(化合物; 62.5uM〜0.244uM)の相互作用を測定し、専用ソフトウェアにて解析を行った。

[0097] [実施例1] ピオグリタゾンとFLJ14797由来タンパク質の相互作用解析

参考例1の方法に従ってFLJ14797よりタンパク質の発現精製を行い、参考例2の方法に従ってピオグリタゾンとFLJ14797から発現精製したタンパク質の相互作用を解析した。結果を図1に示した。ピオグリタゾンの用量に依存して結合量が増大し、かつ高用量では結合の飽和がみられることから、特異的な相互作用であることが確認された。BiacoreS51専用ソフトウェアを用いて結合解離定数を算出したところ、 $KD=9.038 \times 10^{-6}$  Mであった。

[0098] 図1に示した結果から、ピオグリタゾンとFLJ14797由来タンパク質とが相互作用することが明らかとなった。したがって、FLJ14797由来タンパク質は、抗糖尿病薬として知られているピオグリタゾン(チアゾリジン誘導体)の標的タンパク質であることが判明した。このことより、FLJ14797由来タンパク質とスクリーニング候補物質とを作用させることで、新規抗糖尿病剤のスクリーニングを行うことができる。すなわち、FLJ14797由来タンパク質と候補物質との相互作用を、例えば参考例2の方法で検出するような系を構築することによって、新規抗糖尿病薬のスクリーニングを行うことができる。

[0099] [実施例2] 新規化合物(I)とFLJ14797由来タンパク質の相互作用解析

実施例1で使用したピオグリタゾンに代えて上述した化合物A-1、A-2及びA-3を使用した以外は、実施例1と同様にしてFLJ14797由来タンパク質と各化合物との相互

作用を解析した。実施例1と同様に算出されたKD値を表1に示す。

[表1]

化合物	KD (M)
A - 1	$8.431 \times 10^{-6} \text{ M}$
A - 2	$1.382 \times 10^{-5} \text{ M}$
A - 3	$2.156 \times 10^{-5} \text{ M}$

- [0100] 表1から判るように、いずれの化合物においてもFLJ14797由来タンパク質に対する特異的な相互作用がみられた。この結果より、上述した一般式(I)で表される化合物がFLJ14797由来タンパク質すなわち $\gamma$ チューブリン・リング複合体タンパク質に対して相互作用を示すことが明らかとなった。
- [0101] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

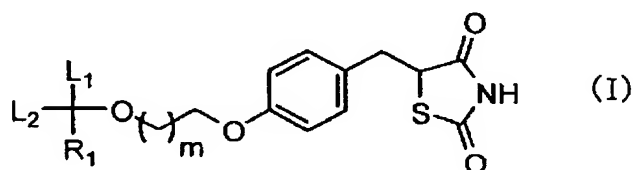
## 請求の範囲

- [1] 以下の(a)又は(b)に示され、抗糖尿病薬の標的タンパク質。  
(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質  
(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、抗糖尿病薬と相互作用するタンパク質
- [2] 上記抗糖尿病薬はチアゾリジン誘導体であることを特徴とする請求項1記載の標的タンパク質。
- [3] 上記チアゾリジン誘導体はピオグリタゾンであることを特徴とする請求項2記載の標的タンパク質。
- [4]  $\gamma$  チュブリン・リング複合体タンパク質であることを特徴とする請求項1記載の標的タンパク質。
- [5] 以下の(a)又は(b)に示され、抗糖尿病薬の標的タンパク質をコードする遺伝子。  
(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質  
(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、抗糖尿病薬と相互作用するタンパク質
- [6] 上記抗糖尿病薬はチアゾリジン誘導体であることを特徴とする請求項5記載の標的タンパク質をコードする遺伝子。
- [7] 上記チアゾリジン誘導体はピオグリタゾンであることを特徴とする請求項6記載の標的タンパク質をコードする遺伝子。
- [8] 上記標的タンパク質は $\gamma$  チュブリン・リング複合体タンパク質であることを特徴とする請求項5記載の標的タンパク質をコードする遺伝子。
- [9] スクリーニング候補物質を以下の(a)又は(b)に示すタンパク質に接触させる工程と、  
(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質  
(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、抗糖尿病薬と相互作用するタンパク質

質

上記候補物質と上記タンパク質との相互作用を検出する工程と、  
を備える抗糖尿病薬のスクリーニング方法。

- [10] 上記抗糖尿病薬はチアゾリジン誘導体であることを特徴とする請求項9記載の抗糖尿病薬のスクリーニング方法。
- [11] 上記チアゾリジン誘導体はピオグリタゾンであることを特徴とする請求項10記載の抗糖尿病薬のスクリーニング方法。
- [12] 上記標的タンパク質は $\gamma$  チューブリン・リング複合体タンパク質であることを特徴とする請求項9記載の抗糖尿病薬のスクリーニング方法。
- [13] 請求項9乃至12いずれか一項記載のスクリーニング方法によってスクリーニングされ、上記タンパク質と相互作用を示す物質を主成分とする抗糖尿病薬。
- [14] 一般式(I)
- [化1]



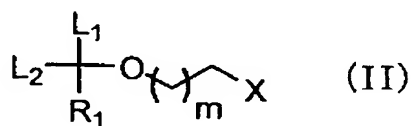
(上記式(I)中、 $R_1$ は、水素、炭素数1～10のアルキル基、炭素数3～7のシクロアルキル基、炭素数7～11のフェニルアルキル基、フェニル基、窒素、酸素及び硫黄からなる群から選ばれる1又は2のヘテロ原子を含む5又は6員環のヘテロ環である。 $L_1$ 及び $L_2$ は、同一又は異なり、それぞれ水素又は炭素数1～3のアルキル基であるか、若しくは、一緒になって炭素数2～6のシクロアルキル基を形成する。 $m$ は1～5のいずれかの整数を表す。)で表されるチアゾリジン誘導体。

- [15] 上記式(I)中、 $L_1$ 及び $L_2$ は、一緒になって形成する炭素数2～6のシクロアルキル基であることを特徴とする請求項14記載のチアゾリジン誘導体。
- [16] 上記式(I)中、 $R_1$ は水素であり、 $L_1$ 及び $L_2$ は一緒になって形成する炭素数2～6のシクロアルキル基であることを特徴とする請求項14記載のチアゾリジン誘導体。
- [17] 上記式(I)中、 $R_1$ は炭素数1～10のアルキル基であり、 $L_1$ 及び $L_2$ は一緒になって形成する炭素数2～6のシクロアルキル基であることを特徴とする請求項14記載のチア

ゾリジン誘導体。

- [18] 5-[4-[2-(1-メチル-シクロヘキシルオキシ)-エトキシ]-ベンジル]-チアゾリジン-2,4-ジオンであることを特徴とする請求項14記載のチアゾリジン誘導体。
- [19] 請求項14乃至18いずれか1項記載のチアゾリジン誘導体の薬理上許容される塩。
- [20] 請求項14乃至18いずれか1項記載のチアゾリジン誘導体及び/又はその薬理上許容される塩を有効成分として含有する医薬組成物。
- [21] 抗糖尿病薬であることを特徴とする請求項20記載の医薬組成物。
- [22] 一般式(II)

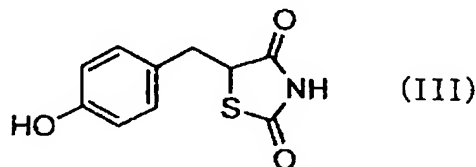
[化2]



(上記式(II)中、 $R_1$ は、水素、炭素数1～10のアルキル基、炭素数3～7のシクロアルキル基、炭素数7～11のフェニルアルキル基、フェニル基、窒素、酸素及び硫黄からなる群から選ばれる1又は2のヘテロ原子を含む5又は6員環のヘテロ環である。 $L_1$ 及び $L_2$ は、同一又は異なり、それぞれ水素又は炭素数1～3のアルキル基であるか、若しくは、一緒になって炭素数2～6のシクロアルキル基を形成する。 $m$ は1～5のいずれかの整数を表す。 $X$ は $MeSO_2$ 、 $p$ -toluenesulfonyl、ヨウ素、臭素、塩素及び水酸基からなる群から選ばれる一種である。)

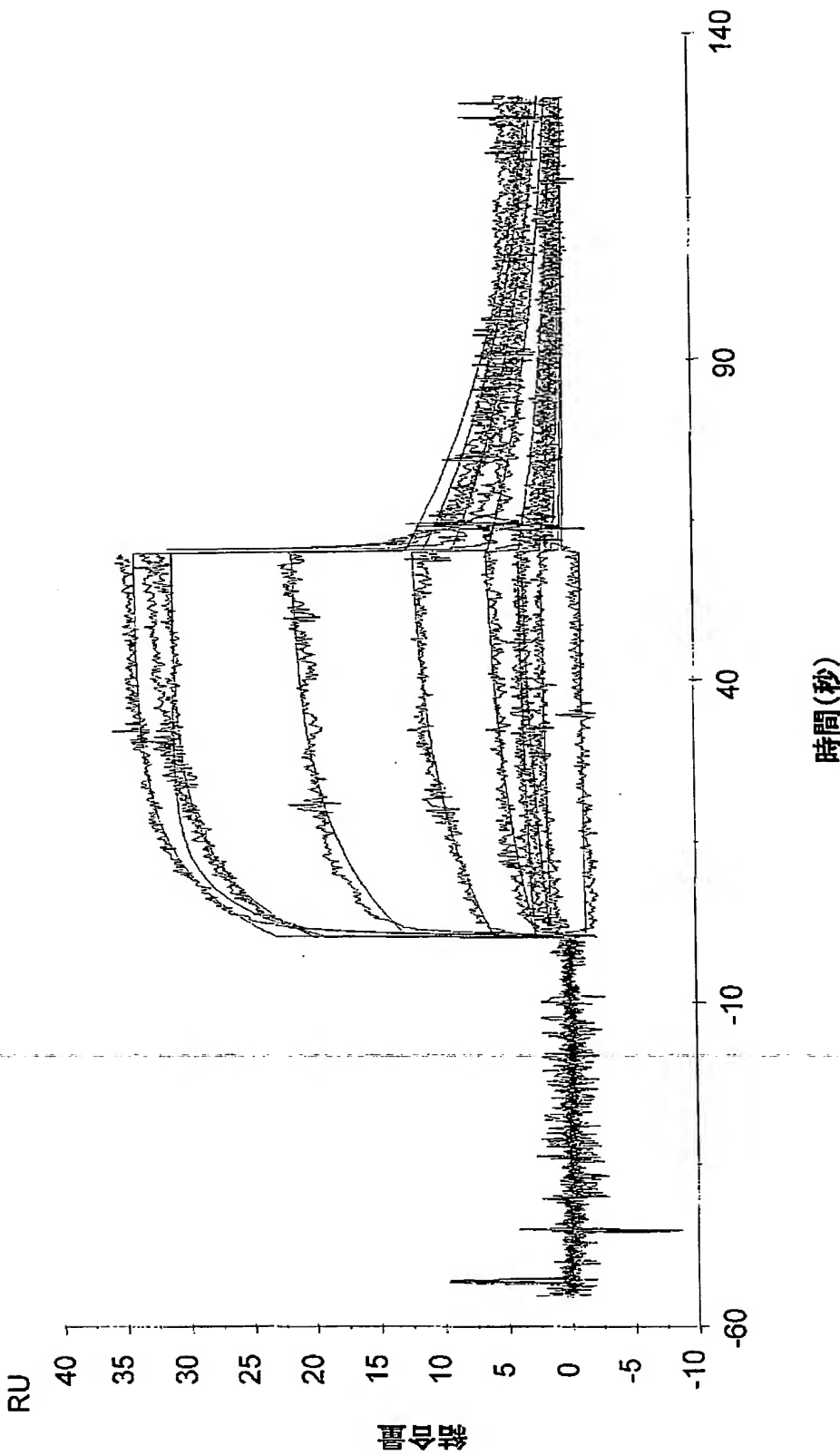
で表される化合物と、一般式(III)

[化3]



で表される化合物とを縮合反応させる、チアゾリジン誘導体の製造方法。

[図1]



[図2]

## CLUSTAL W (1.8) multiple sequence alignment

```
gi|7656841|ref|NP_055259.1| MIHELLLALSGYPGSI FTWNRSGLQVSQDFPFLHPSETSVLNRLCRLGT 50
|cl|FLJ14797 MIHELLLALSGYPGSI FTWNRSGLQVSQDFPFLHPSETSVLNRLCRLGT 50
*****

gi|7656841|ref|NP_055259.1| DYIRFTEFIEQYTGHVQQQDHHP SQGGGGLHGI YLRAFCTGLDSVLQPY 100
|cl|FLJ14797 DYIRFTEFIEQYTGHVQQQDHHP SQGGGGLHGI YLRAFCTGLDSVLQPY 100
*****

gi|7656841|ref|NP_055259.1| RQALLDLEQEF LGDPHLSI SHVNYFLDQFQLLFPSVMVVEQIKSQI HG 150
|cl|FLJ14797 RQALLDLEQEF LGDPHLSI SHVNYFLDQFQLLFPSVMVVEQIKSQI HG 150
*****

gi|7656841|ref|NP_055259.1| CQILETVYKHSCGGLPPVRSALEK I LAVCHGV MYKQLSAWMLHGLLLDQH 200
|cl|FLJ14797 CQILETVYKHSCGGLPPVRSALEK I LAVCHGV MYKQLSAWMLHGLLLDQH 200
*****

gi|7656841|ref|NP_055259.1| EEFFIKQGPSSGNVSAQPEEDED LGI GGLTGKQLRELQDLRL IEENML 250
|cl|FLJ14797 EEFFIKQGPSSGNVSAQPEEDED LGI GGLTGKQLRELQDLRL IEENML 250
*****

gi|7656841|ref|NP_055259.1| APSLKQFSLRVE ILPSYI PVRVAEK I LFGESVQMFENQNVNL TRKGS IL 300
|cl|FLJ14797 APSLKQFSLRVE ILPSYI PVRVAEK I LFGESVQMFENQNVNL TRKGS IL 300
*****

gi|7656841|ref|NP_055259.1| KNQEDTFAAELHRLKQQLFSLVDFEQVVDRI RSTVAEHLWKL MVEESDL 350
|cl|FLJ14797 KNQEDTFAAELHRLKQQLFSLVDFEQVVDRI RSTVAEHLWKL MVEESDL 350
*****

gi|7656841|ref|NP_055259.1| LGQLKI IKDFYLLGRGELFQAF IDTAQHMLKTPPTAVTEHDVNVA FQQSA 400
|cl|FLJ14797 LGQLKI IKDFYLLGRGELFQAF IDTAQHMLKTPPTAVTEHDVNVA FQQSA 400
*****

gi|7656841|ref|NP_055259.1| HKVLLDDDNLLPLLHLTI EYHGKEHKADATQAREGPSRETS PREAPASGW 450
|cl|FLJ14797 HKVLLDDDNLLPLLHLTI EYHGKEHKADATQAREGPSRETS PREAPASGW 450
*****

gi|7656841|ref|NP_055259.1| AALGLSYKVQWPLHILFTP AVLEKYNVVF KYLLSVRRVQAE LQHCWALQM 500
|cl|FLJ14797 AALGLSYKVQWPLHILFTP AVLEKYNVVF KYLLSVRRVQAE LQHCWALQM 500
*****

gi|7656841|ref|NP_055259.1| QRKHLKSNQTDAI KWRLRNHMAFLVDNLQYYLQVDVLESQFSQL LHQINS 550
|cl|FLJ14797 QRKHLKSNQTDAI KWRLRNHMAFLVDNLQYYLQVDVLESQFSQL LHQINS 550
*****

gi|7656841|ref|NP_055259.1| TRDFESIRLAHDHFLSNLLAQSF ILLKPVFHC LNEILDCHSFCSLVSQN 600
|cl|FLJ14797 TRDFESIRLAHDHFLSNLLAQSF ILLKPVFHC LNEILDCHSFCSLVSQN 600
*****

gi|7656841|ref|NP_055259.1| LGPLDERGAAQLSILVKGFSRQSSLLFKILSSVRNHQINSDLAQLLLRLD 650
|cl|FLJ14797 LGPLDERGAAQLSILVKGFSRQSSLLFKILSSVRNHQINSDLAQLLLRLD 650
*****

gi|7656841|ref|NP_055259.1| YNKYYTQAGGT LGSFGM 667
|cl|FLJ14797 YNKYYTQAGGT LGSFGM 667
*****
```

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/016996

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, A61K31/426, 31/4439, 45/00, A61P3/10, 43/00, C07D277/34, 417/12, G01N33/15, 33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PIR/SwissProt/GeneSeq, BIOSIS/WPI (DIALOG)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Fava F. et al., Human 76p: A new member of the gamma-tubulin-associated protein family. J.Cell Biol., 1999, 147(4), p.857-68	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
02 February, 2005 (02.02.05)Date of mailing of the international search report  
22 February, 2005 (22.02.05)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/016996

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
Claims 1 to 8.

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016996

### <Unity of invention>

The inventions according to claims 1 to 22 are divided into the following invention groups.

(1) Inventions relating to a target protein of an antidiabetic agent comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 according to the present application and matters relating thereto (claims 1 to 8).

(2) Inventions relating to a method of screening a candidate substance for an antidiabetic agent by using a protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 according to the present application and matters relating thereto (claims 9 to 13).

(3) Inventions relating to a thiazolidine derivative represented by the general formula (I) as set forth in claim 14 and a method for producing the same (claims 14 to 22).

Although the matter common to the invention groups (1) and (2) resides in a protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 according to the present application, it is clarified, as the results of the search, that this common matter is not novel since the corresponding protein is reported in J. Cell Biol., 1999, 147(4), p.857-68.

Namely, the above common matter falls within the category of the prior art and, therefore, cannot be considered as a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2.

Thus, there is no matter common to all claims.

Moreover, there is no matter common to the invention groups (1) and (3). Concerning the invention groups (2) and (3), the method relating to the invention group (2) is not employed in the method of producing a thiazolidine derivative relating to the invention group (3). Thus, there is no special technical feature common to these invention groups too.

As discussed above, the invention groups (1) to (3) have no matter in common seemingly being a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2 and no technical relevancy can be found out among these inventions differing from each other in the meaning within PCT Rule 13.

Such being the case, the above invention groups do not comply with the requirement for unity of invention.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K 14/47, A61K31/426, 31/4439, 45/00, A61P3/10, 43/00, C07D277/34, 417/12, G01N33/15, 33/50

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K 14/47

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, PIR/SwissProt/GeneSeq, BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Fava F. et al., Human 76p: A new member of the gamma-tubulin-associated protein family. J. Cell Biol., 1999, 147 (4), p. 857-68	1-8

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02. 02. 2005

国際調査報告の発送日

22. 2. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4 B

3 1 3 1

電話番号 03-3581-1101. 内線 3448

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。  
特別ページ参照。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲1-8

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

<発明の単一性について>

請求の範囲1-22に係る発明は以下の発明群に分けられる。

- ①本願配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる、抗糖尿病薬の標的タンパク質およびそれに係るもの（請求の範囲1-8）
- ②本願配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質を用いる抗糖尿病薬の候補物質のスクリーニング方法およびそれに係るもの（請求の範囲9-13）
- ③本願請求項14の一般式(I)に示されるチアゾリジン誘導体およびその製造方法に係るもの（請求の範囲14-22）

発明群①と②に共通の事項は、本願配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質であるが、調査の結果、J. Cell Biol., 1999, 147(4), p. 857-68には該タンパク質が記載されており、上記共通事項は新規でないことが明らかとなった。

即ち、上記共通事項は先行技術の域を出ないので、PCT規則13.2の第2文の意味における特別な技術的特徴ではない。

それ故、請求の範囲全てに共通の事項はない。

また、発明群①と③には共通の事項が存在しない。発明群②と③について、発明群②に係る方法は、発明群③に係るチアゾリジン誘導体を製造する方法でも使用する方法でもなく、両発明群に共通の特別な技術的特徴は存在しない。

以上により、発明群①-③にはPCT13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる共通の事項は存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見出すことはできない。

よって、上記発明群は単一性の要件を満たしていない。